

Title	安息香酸々化酵素について
Author(s)	和田, 恵
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/28297
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【17】

氏名・(本籍)	和田 恵 わだ めぐむ
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 141 号
学位授与の日付	昭和 35 年 11 月 4 日
学位授与の要件	医学研究科生理系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	安息香酸々化酵素について (主 査) (副 査)
論文審査委員	教授 須田 正巳 教授 天野 恒久 教授 西沢 義人

論 文 内 容 の 要 旨

目 的

逐次適応酵素系に於ては代謝上位の物質Aに適応した菌はAのみならずAの下位物質 BCD....の酵素系をも逐次的に形成せしめる事が知られているがこの方法を用いて安息香酸の代謝経路を追跡する事が出来る。即ち *Ps. fluorescence* A₃-12 の菌浮游液についてマンデル酸に適応した菌はマンデル酸、安息香酸、カテコール....を誘導期なしに酸化する事が出来るが、安息香酸適応菌は安息香酸カテコールのみを直ちに酸化する。従ってマンデル酸は代謝上位にあり、マンデル酸は安息香酸を経て分解されると考えられる。しかしこのマンデル酸代謝経路に於て、安息香酸を除いた他の酵素についてはその性質及反応機作が明らかにされているが、安息香酸酸化酵素についてはその適応菌が安息香酸をよく代謝しても果して実際酵素が生成されているかどうか酵素的証明は出来なかった。それ故この酵素を細胞外に取り出し、その性質及反応機作について明らかにする必要がある。

方 法

(A) 適 応 菌

Ps. fl. A₃-12 を Pepton-Bouillion 培地で 30°C 14 時間増菌したものを安息香酸を唯一の C 源とするシモンの培地 20 立 (pH 7.0) に懸濁し、aeration しながら 30°C 6 時間増殖後集菌 M/20 phosphate Buffer にて洗滌して凍結貯蔵したものを酵素源とした。

(B) 活性測定には Warburg 検圧計を用い酸素吸収の速度を測定した。

(C) TPNH regenerating system は glucose-6-phosphate dehydrogenase をビール酵母より A. Kornberg の方法により抽出し、部分的精製したものをを用いた。

(D) 放射能活性は Nuclear Chicago 製 Gas Flow Counter を用い infinitive thinness 法にて測定した。

結 果

(A) 酵素精製と co-factor

安息香酸適応菌体を *Mc. Ilwain* のアルミナ法により磨砕し100,000×g60分遠心の上清を粗酵素として用いた。この上清は co-factor として、二価鉄を必要とする。又この酵素液により1モルの安息香酸は2分子の酸素吸収, 1分子のCO₂放出後1モルのβ-ケトアジピン酸へと酸化される。この酵素液をM/10KClにて5時間透析して得られた preparation は二価鉄以外に TPNH を必要とする。しかし更に rat liver の boiled extract を上記 co-factor に加える事によって, 著明な活性の回復が認められる。精製を一步進めて, RNAase DNAase を用いて粗酵素液を除核酸した後飽和硫酸にて0~30%, 33~50%, 50~75%の3つの Fraction に分け上記3つの co-factor 存在下で各分割の活性を調べたがどの Fraction にも活性は認められなかった。しかし, 33~50%と50~75%の分割を一諸にした系では著明な活性が認められた。この事から何れか一方の分割が真の安息香酸酸化酵素系であり他の分割は適応菌体外の酵素系で代用し得るのではないかと考え, 安息香酸を代謝し得ない酵素系として rat liver extract を使用して上記分割に附加してみた。その結果 Fraction 50~75%に rat liver extract を加えたものは全く活性を示さなかったのに反し33~50%の Fraction に rat liver extract を加えると著明な活性を示す事がわかった。

(B) 中間物質

中間物質と想定されるo-, m-, p-, hydroxy 安息香酸及 protocatechuric acid, 2-3-dihydroxy安息香酸等を基質とした場合全く酸素吸収を認める事が出来なかった。この事から安息香酸からカテコールまでの反応に於て上記の様な安定な化合物が中間物であるとは考え難い。

(C) isotope 実験

ベンゼン核の1の位置にC¹⁴ でラベルされた安息香酸を基質として用い酸素吸収を測定しつつ反応を追跡し反応が終った事を確認した後にラベルされていないβ-ケトアジピン酸を Carrier として加え反応液を酸性にして凍結乾燥する。β-ケトアジピン酸をアセトンにて抽出後その放射能比活性が一定となるまで再結晶を行った。この比活性から安息香酸から1モルのβ-ケトアジピン酸が形成される事を確認した。又この radioactive なβ-ケトアジピン酸の何処の位置にラベルしているかを調べた所カルボキシル基にラベルされている事が明らかとなった。この事実から安息香酸の1及2の位置に OH 基が添加されていると考えられる。

総括, 考按

Ps. fl. A₃-12 の安息香酸適応菌体より安息香酸酸化酵素が無細胞状態で抽出された。この酵素は Fe⁺⁺ TPNH 及び未だ不明の co-factor を必要とする。又ラベルされた安息香酸を用いる事により基質の1及び2の位置に dihydroxylation が起る事が明らかとなった。この反応の詳細は未だ不明であるが, その co-factor の要求性等から見て従来に見られない新しいタイプの反応ではないかと考えられる。

論文の審査結果の要旨

Pseudomonas 属の菌に於て安息香酸が, カテコール, シス-シスムコン酸を経てβ-ケトアジピン酸へ

と分解される事は逐次適応性を用いた実験から明らかにされているが、その酵素レベルでの実体的証明は現在までなされていない。

本論文はこの点を解明すべく、*Ps.fl.*A3-12 を用いて安息香酸適応菌から酵素の細胞外抽出を試み、その実存性を証明すると共に進んでその性質及び反応機作について実験を行った。その結果この酵素は二価鉄、還元形 pyridine nucleotide 及び未だ不明の co-factor を必要とする事、又ラベルされた安息香酸 (1- C^{14} benzoate) を用いる事により基質の 1 及び 2 の位置に OH 基添加が起る事が明らかになった。この反応の詳細は未だ不明であるが、その co-factor の要求性などからみて脱水素酵素或は electron carrier system の関与しない新しいタイプの酸化反応 (Oxygenase Type) ではないかと考えられる。